



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UN AISLADO FÚNGICO CON NOTABLE ACTIVIDAD
PECTINOLÍTICA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

PQFB. Mariela Mondragón Guido

ASESORES:

Doctor Ciencias en Biología Experimental, Bioquímica

MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

Maestra Ciencias en Ingeniería Bioquímica

MARIANA ALVAREZ NAVARRETE

MORELIA, MICHOACÁN JUNIO DE 2014



Índice general

1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
3. Pared celular	7
4. Pectina	8
4.1. Estructura química de las pectinas	8
4.1.1. Protopectina	10
4.1.2. Ácidos pécticos	10
4.1.3. Ácidos pectínicos:	10
4.2. Composición química de la pectina	10
4.2.1. Homogalacturonana (HG):	11
4.2.2. Ramnogalacturonana I:	11
4.2.3. Ramnogalacturonana II	11
5. Grado de esterificación	12
5.1. Enlaces de calcio	12
6. Enzimas pectinolíticas	13
6.1. Función de las enzimas pectinolíticas	13
6.2. Clasificación de las enzimas pectinolíticas	14
6.2.1. Pectin liasas (PLs):	14
6.2.2. Poligalacturonasas (PGs):	14
6.2.3. Pectin metil esterasas (PME):	15
7. Microorganismos productores de pectinasas	15
8. Aplicaciones industriales de las pectinasas	17
9. Costo de producción de enzimas	18
10. Justificación	19
11. Preguntas de investigación	20
12. Objetivos	21
12.1. General	21
12.2. Específicos	21
13. Materiales y métodos	22
13.1. Material biológico	22



13.2.	Medio de mantenimiento y propagación.....	22
13.3.	Determinación de índice pectinolítico (IP).....	22
13.4.	Análisis de correspondencia	23
13.5.	Identificación molecular del aislado fúngico	23
13.5.1.	Extracción del DNA genómico	23
13.5.2.	Amplificación de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) 23	
13.6	Curso temporal de la actividad pectinolítica en fermentación en cultivo líquido	24
13.7	Cuantificación de proteína.....	24
13.8	Determinación de la actividad pectinolítica.....	25
13.9	Concentración de la proteína extracelular de las fermentaciones líquidas.....	25
13.10	Electroforesis en gel SDS-PAGE	25
13.10.1	Zimograma	25
13.10.2	Tinción con nitrato de plata.....	26
14.	Conclusión.....	27
15.	Referencias bibliográficas.....	28



Índice de figuras

Figura	Página
1. Pared celular vegetal primaria.....	7
2. Estructura química de la molécula de pectina.....	9
3. Estructura química de un segmento de ácido poligalacturónico.....	9
4. Componentes principales de los polisacáridos pécticos: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) y ramnogalacturonana II (RG-II).....	12
5. Mecanismos de acción de las enzimas pectinolíticas.....	15

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Diversidad de enzimas pécticas producidas por microorganismos.....	16
2. Aplicaciones de las pectinasas.....	17
3. Condiciones de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24



Resumen

Las pectinasas tienen diversas aplicaciones industriales por lo que se ha intensificado la búsqueda de organismos con una producción significativa de estas enzimas. En particular, los hongos filamentosos destacan por su capacidad para producir enzimas extracelulares, es por ello la importancia de estudios de diversidad enzimática de este grupo de microorganismos. El objetivo de este trabajo fue seleccionar un aislado fúngico con notable actividad pectinolítica. 103 hongos aislados de tres ecosistemas diferentes (frutícola, hortícola y boscoso) se propagaron en medio basal enriquecido con pectina al 1 % (w/v), las placas se tiñeron con una solución de hexadecil trimetil amonio al 1 % (w/v), el área de la pectina degradada se observó como una zona transparente, el índice pectinolítico (IP) se determinó al dividir el diámetro de degradación de la pectina entre el diámetro de crecimiento de las colonias. Un análisis de correspondencia se realizó para conocer la distribución de los 20 aislados fúngicos con el mayor IP, en función del crecimiento (CREC), ecosistema (ECO) e IP. La actividad pectinolítica extracelular se registró cada 24 horas durante 14 días en medios de fermentación líquida. La cantidad de azúcares reductores liberados se midió por el método de DNS. El 98 % de los aislados tuvo un $IP \geq 1.0$. El aislado 47 se seleccionó ya que tuvo el máximo valor de IP y presentó un crecimiento moderado en relación al resto de los aislados fúngicos, el cual se identificó por técnicas moleculares. En base al análisis de correspondencia, un grupo de hongos obtenidos de hortalizas mostró un elevado patrón de degradación respecto al IP. Los resultados de la secuenciación de la región ITS demostraron que el aislado 47 es *Fusarium solani* con un 100 % de identidad, número de acceso JQ910159.1 (MegaBLAST, NCBI). La máxima actividad pectinolítica (0.14 mU/mg) se observó a las 72 h del curso temporal de la fermentación.

Palabras clave: Pectina, pectinasas, *Fusarium solani*

Abstract

Pectinases have various industrial applications which has intensified the search for bodies with a significant production of these enzymes. In particular, filamentous fungi known for their ability to produce extracellular enzymes, which is why the importance of studies of enzymatic diversity of this group of microorganisms. The aim of this study was to select a fungal isolate with remarkable pectinolytic activity. 103 fungi isolated from three different ecosystems (fruit, vegetable and forest) were propagated in basal medium supplemented with 1% pectin (w/v), the plates were stained with a solution of hexadecyl trimethyl ammonium 1% (w/v), the area of the degraded pectin is noted as a transparent area, the pectinolytic index (IP) was calculated by dividing the diameter of pectin degradation between the diameter of colony growth. A correspondence analysis was performed to determine the distribution of the 20 fungal isolates with the highest IP, depending on the growth (CREC), ecosystem (ECO) and IP. The extracellular pectinolytic activity was recorded every 24 hours for 14 days in liquid fermentation. The amount of reducing sugars released was measured by the DNS method. 98% of the isolates had an $IP \geq 1.0$. The isolated 47 was selected because it had the maximum value of IP and had moderate growth relative to the rest of the fungal isolates, which were identified by molecular techniques. Based on the correspondence analysis, a group of fungi obtained from vegetables showed a high degradation pattern compared to IP. The results of the sequencing of the ITS region showed that the isolated 47 *Fusarium solani* is a 100 % identity, accession number JQ910159.1 (MegaBLAST, NCBI). Maximum pectinolytic activity (0.14 mU/ mg) was observed at 72 h of the time course of the fermentation.

1. Introducción

La pectina es un polisacárido de estructura compleja, cuya modificación o completa degradación requiere de la participación de diferentes enzimas, entre las cuales se encuentran las poligalacturonasas, pectin metil esterasas y pectin liasas, que son las encargadas de promover la ruptura de la molécula de pectina mediante un ataque a la cadena principal (Nair y Panda, 1997). Las pectinasas microbianas son de gran interés comercial, y tienen múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, fundamentalmente en el procesamiento de frutas y vegetales; actualmente las enzimas pécticas para uso comercial se producen a partir del hongo *Aspergillus niger* (Pariza y Johnson, 2001).

Los estudios demuestran que alrededor del 50-55 % de la producción de pectinasas microbianas se lleva a cabo con hongos filamentosos ya que estos microorganismos son capaces de secretar una gran cantidad de enzimas, además de proporcionar un fácil manejo y bajo costo de manipulación (Patil y Dayanand, 2006). La exploración de la diversidad del mundo microbiano conducirá al descubrimiento de nuevos organismos que posean características especiales en la degradación de la pectina. Un estudio exploratorio de la actividad pectinolítica se realizó y un aislado fúngico con notable actividad se seleccionó en base a su capacidad de degradación de la pectina en medio sólido, se identificó molecularmente y se monitoreó su actividad pectinolítica extracelular por fermentación en estado líquido. Una separación electroforética se realizó para evaluar la presencia de enzimas pectinasas en los extractos de la fermentación.

2. Antecedentes

En el mundo se estima que existen aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos, de las cuales se conoce solo el 4.6% (Hawksworth, 1991). Tan solo en México podrían existir 200,000 especies, de las cuales solo se han descubierto el 3.5% (Guzmán, 1998). Por ello la importancia de realizar estudios sobre la biodiversidad de este grupo de microorganismos.

En la actualidad se sabe que los hongos filamentosos son los principales agentes infecciosos de las plantas (Knogge, 1998). El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir los tejidos de la planta, alterar su fisiología y reducir el crecimiento de toda la planta o de determinados órganos, al secretar un conjunto de enzimas extracelulares que les ayudan a crecer, multiplicarse y absorber los nutrientes de la planta. Un grupo importante de enzimas que participan en el proceso de infección, particularmente en la degradación de las paredes celulares, son las pectinasas. Su historia comenzó con la comprensión de la estructura de las sustancias pécticas y el mecanismo por el cual, las enzimas pectinolíticas degradan estas sustancias. Más tarde, la producción microbiana de pectinasas se destacó por muchas décadas debido a sus diversas aplicaciones, teniendo que algunos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos pueden producir pectinasas (Whitehead *et al.*, 1995).

El mundo microbiano ha demostrado ser heterogéneo en su capacidad de sintetizar diferentes tipos de enzimas pectinolíticas con diferentes mecanismos de acción y propiedades bioquímicas (Favela-Torres *et al.*, 2006; Gummadi y Panda, 2003). Las enzimas pectinolíticas son producidas tanto por microorganismos procariotes, que sintetizan principalmente pectinasas alcalinas, y por los eucariotes, que en su mayoría sintetizan pectinasas ácidas (Hoondal *et al.*, 2002; Jayani *et al.*, 2005; Kashyap *et al.*, 2001). La producción de estas enzimas también se ha descrito en levaduras (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 1999). Diversos estudios se han llevado a cabo respecto a la caracterización de diferentes enzimas pectinolíticas microbianas sobre su mecanismo de acción y propiedades bioquímicas. El pH óptimo en el que

estas enzimas pueden actuar es en un intervalo de 3.5 a 11, mientras que las temperaturas óptimas varían entre 40-75 °C, pero también se deben tener en cuenta las características del sustrato sobre el cual actúan y el efecto que tienen estas enzimas (Gummadi y Panda, 2003; Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002).

Las investigaciones demostraron que las pectinasas son inducibles y se pueden producir a partir de diferentes fuentes de carbono. En las últimas décadas, numerosos estudios se han realizado para optimizar las fermentaciones, así como diferentes estrategias para la producción de pectinasas (Friedrich *et al.*, 1989). Con la llegada de la biología molecular, la investigación sobre la clonación y expresión de genes de pectinasas ha aumentado (Sathyanarayana y Panda, 2003).

Las pectinasas más ampliamente utilizadas a nivel industrial son de *Aspergillus niger*, ya que este hongo posee un estatus GRAS (acrónimo en Inglés de “generalmente considerado como seguro”) (Pariza y Johnson, 2001). Esta especie fúngica produce varias enzimas pectinasas que incluyen poligalacturonasas (PG) y pectinesterasas (PE) que son utilizadas con fines específicos (Sathyanarayana y Panda, 2003).

Las enzimas pectinasas se pueden producir ya sea por fermentación en estado líquido o sólido. Varios factores relacionados con el medio ambiente afectan la producción de las pectinasas. Algunos de ellos son la concentración de nutrientes, el pH, la temperatura y el contenido de humedad. Tanto la fuente de carbono como de nitrógeno muestran un fuerte efecto sobre la productividad de pectinasas (Almeida *et al.*, 2003).

Los sustratos deben proporcionar todos los nutrientes necesarios a los microorganismos para su crecimiento. Cuando se añade pectina, glucosa y sacarosa a los medios de cultivo en una concentración mayor a la determinada, estas sustancias tienen un efecto represivo sobre la actividad de las pectinasas (Teixeira *et al.*, 2000). Generalmente, los residuos agroindustriales se emplean para la producción de pectinasas. Entre los sustratos utilizados se encuentran el bagazo de caña, salvado de trigo, salvado de arroz, paja de trigo, paja de arroz, mazorcas de maíz, fibra de coco, residuos de plátano, residuos de té, pulpa de remolacha, manzana y cáscara de naranja (Blanco *et al.*, 1999).

Una de las vías recientemente estudiadas en Colombia para la producción de pectinasas es a partir de fermentación en estado semisólido, con el empleo de cáscaras de naranja como sustrato (García y Ramírez, 2008). En este estudio se identificaron las mejores condiciones de operación para la producción de estas enzimas y obtuvieron extractos enzimáticos con actividad pectinolítica y otros metabolitos.

3. Pared celular

La pared celular es una estructura que determina la forma de las células y las mantiene unidas, provee fuerza mecánica y rigidez, y actúa como una barrera contra el ataque de patógenos. La pared celular primaria es una red de microfibrillas de celulosa donde las regiones altamente cristalinas alternan con regiones menos organizadas, que están embebidas en una matriz hidrofílica de hemicelulosas y pectinas (Fig. 1) (Hosmer Caffall y Mohnen, 2009). En plantas dicotiledóneas, la composición general de la pared celular primaria es aproximadamente 30% de celulosa, 30% de hemicelulosas, 35% de pectinas y 5% de proteínas estructurales, aunque en paredes celulares de frutos, el contenido de pectinas puede ser sustancialmente mayor y el de proteínas menor (Cutillas-Iturralde *et al.*, 1993).

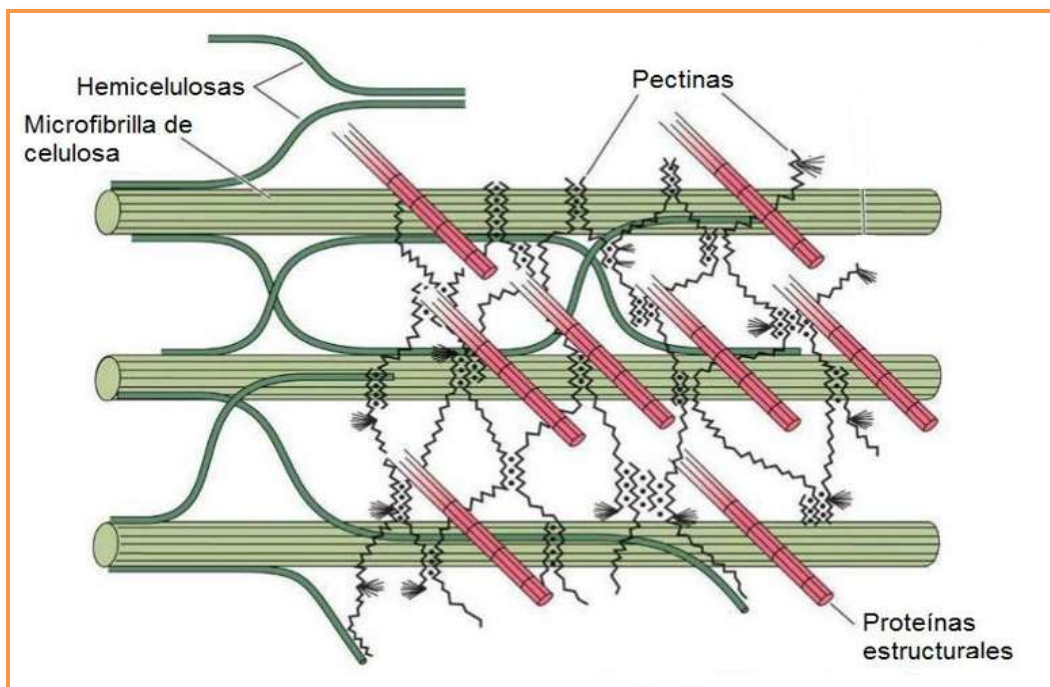


Figura 1. Pared celular vegetal primaria. (Tomada de Brett y Waldron, 1996).

4. Pectina

La pectina fue descubierta en 1790, cuando Vauquelin encontró una sustancia soluble a partir de los zumos de fruta. En 1825, el científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y encontró que "una sustancia muy abundante en plantas vivas que ya se había observado en el pasado, tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución". La llamó "pectina ácida" del griego "pectos" que significa sólido coagulado. La pectina fue definida por Kertesz (1952) como ácidos pectínicos solubles en agua de un grado de metilación variable, son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas (Fredes Monsalves *et al.*, 2009).

La pectina es un polisacárido complejo heterogéneo que se encuentra en las paredes celulares de las plantas superiores (Okafor *et al.*, 2010) y se caracteriza por contener azúcares acídicos, como el ácido galacturónico, y azúcares neutros, tales como ramnosa, galactosa y arabinosa. Las pectinas pueden ser extraídas con agua caliente, agentes quelantes o ácidos diluidos (Fischer y Bennett, 1991). Son los únicos polisacáridos responsables de la cohesión celular (Sarkar *et al.*, 2009). En los países en desarrollo, las pectinas se acumulan junto con la celulosa y la hemicelulosa, y contribuyen a la gran cantidad de polímeros que se encuentran en las fibras vegetales disponibles, principalmente como desechos agrícolas y municipales (Schols y Voragen, 1996). La pectina forma parte de la pared celular primaria y su función es estabilizar a las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas (Annis y Goodwin, 1997).

A nivel industrial, la fuente de obtención de la pectina se encuentra limitada a las cáscaras de frutos cítricos, que contienen cerca del 25% de sustancias pécticas y del bagazo de manzana, con alrededor del 15 a 18% de pectina. Otras fuentes de pectina incluyen cáscaras de mango, residuos de girasol y guayaba (Páez *et al.*, 2005).

4.1. Estructura química de las pectinas

Las pectinas son largos polisacáridos constituidos por unidades de ácido D-galacturónico, unidos entre sí por enlaces α -1,4. En el ácido poligalacturónico entre el 80 al 95 % de los grupos carboxilo (-COOH) están esterificados con alcohol metílico y los hidroxilos secundarios pueden estar acetilados (Fig. 2) (Brumano *et al.*, 1993).

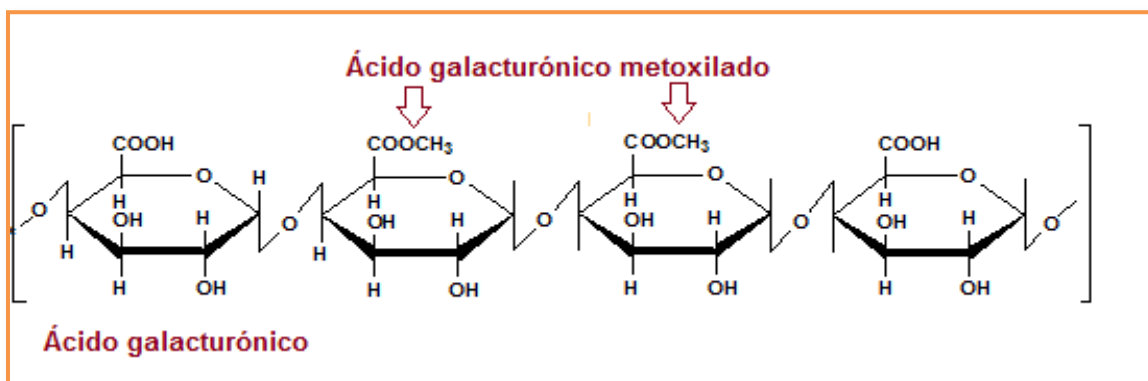


Figura 2. Estructura química de la molécula de pectina.

Al porcentaje de unidades de ácido galacturónico esterificadas se le conoce como grado de esterificación (DE). El amoníaco se utiliza para desesterificar una pectina con un número significativo de grupos metoxilo produciendo su amidación (Wakabayashi, 2000). Azúcares neutros también están presentes, sobre todo la L-ramnosa (Ishii y Matsunaga, 2001). Las pectinas se caracterizan principalmente por su contenido en ácido galacturónico, por la longitud de sus cadenas y por el número de grupos sustituyentes (Fig. 3).

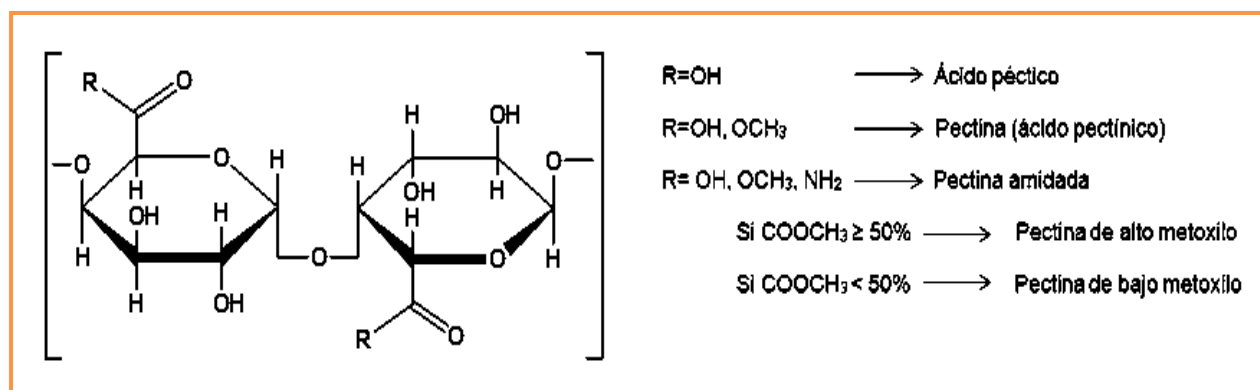


Figura 3. Estructura química de un segmento de ácido poligalacturónico.

Las sustancias pécticas se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales, especialmente en los tejidos parenquimáticos y meristemáticos, en donde las zonas más ricas corresponden a la pared primaria de las células y a la lámina media que las separa. En estas zonas de la célula, la protopectina, término utilizado para designar a

las sustancias pécticas recién sintetizadas e insolubles de los tejidos vegetales, se halla asociada a los otros constituyentes de la membrana (celulosa, hemicelulosa, lignina, etc.) mediante uniones físicas y/o químicas actuando como “cementante intercelular”, proporcionando así rigidez a los tejidos (Jacob *et al.*, 2008).

De acuerdo al tipo de modificación que presenta la cadena principal o esqueleto de la molécula, el término genérico pectina puede aplicarse a: protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico y pectina (Caffall y Mohnen, 2009).

4.1.1. Protopectina: es una matriz de sustancias pécticas que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. Protopectina es el término utilizado para describir las sustancias pécticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y a partir de las cuales se forman las sustancias pécticas solubles.

4.1.2. Ácidos pécticos: son galacturonanas que no contienen grupos metilos. También pueden denominarse ácido poligalacturónico. A las sales de los ácidos pécticos se les llama pectatos o poligalacturonanas.

4.1.3. Ácidos pectínicos: son galacturonanas con cantidades variables de grupos metilo esterificados con los grupos carboxilo del C-6. A las sales de los ácidos pectínicos se les llama pectinatos. Estas sustancias tienen la propiedad de formar geles con azúcares y ácidos, y si el contenido de metilos es bajo, con otros componentes como sales de calcio.

4.2. Composición química de la pectina

Tres polisacáridos pécticos se conocen, los cuales se han aislado a partir de paredes celulares primarias y estructuralmente se han caracterizado (Fig. 4) (Doco *et al.*, 2001).

4.2.1. Homogalacturonana (HG): es una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1,4 en donde algunos de los grupos carboxilo están esterificados con grupos metilo. En función de la fuente vegetal, también pueden estar parcialmente O-acetilados en el C-2 ó C-3 (Ishii *et al.*, 1999).

4.2.2. Ramnogalacturonana I: es un polímero formado por al menos 100 repeticiones del disacárido (1-2)- α -L-ramnosa-(1-4)- α -D-galacturonato. Su distribución es heterogénea y generalmente aparece unida a la homogalacturonana mediante enlaces glicosídicos. Entre el 20 y el 80 % de las unidades de ramnosa existen cadenas laterales. Estas cadenas pueden tener entre 1 y 50 residuos, que son mayoritariamente neutros.

4.2.3. Ramnogalacturonana II: es un polímero muy conservado que tiene una estructura básica de al menos 8 residuos de galactosa unidos mediante enlaces α -1,4 y que contiene cuatro cadenas poliméricas laterales, que además de los azúcares frecuentes también contienen otros menos abundantes como apiosa o C-3-carboxi, 5-desoxi-L-xilosa (ácido acérico) (Vidal *et al.*, 2000). Una de las características principales de la ramnogalacturonana II es que se puede dimerizar y formar puentes borato con dos enlaces éster a través de los residuos de apiosa (Kobayashi *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 1999).

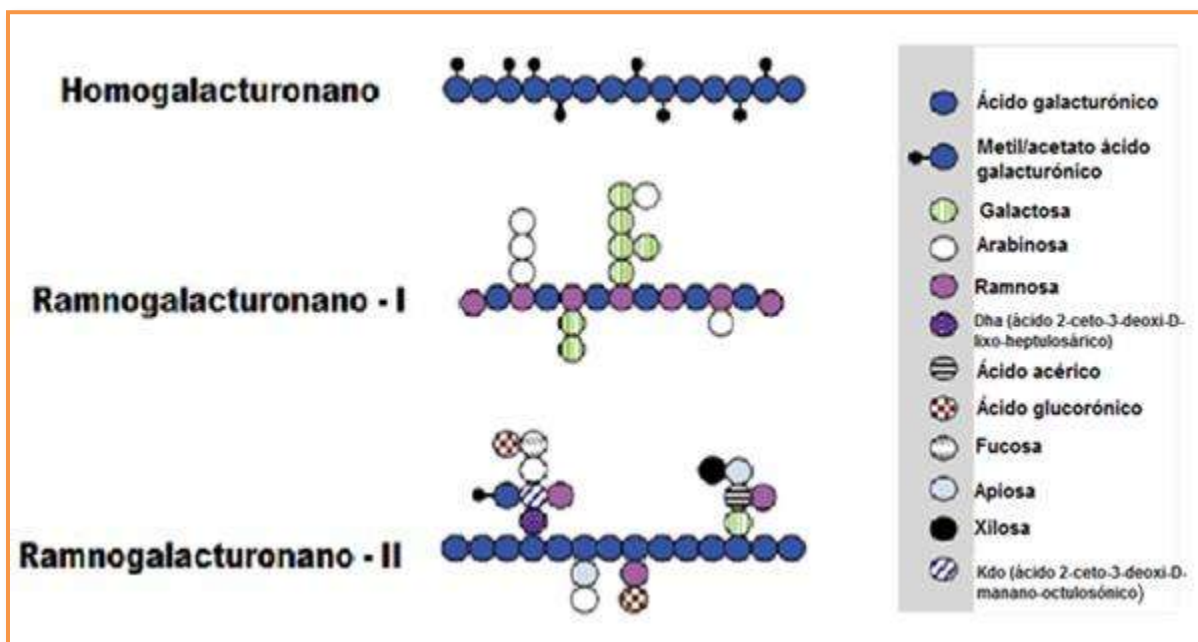


Figura 4. Componentes principales de los polisacáridos pécticos: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) y ramnogalacturonana II (RG-II). (Tomada y modificada de Palin y Geitmann, 2012).

5. Grado de esterificación

Las propiedades funcionales de la pectina dependen, entre otros factores, de su DE (Serguschenko *et al.*, 2007). Diversos autores indican que con la maduración disminuye el contenido y la calidad de las pectinas (capacidad de gelificar). Esta última característica es definida por su grado de metoxilación (Vicens *et al.*, 2009; Donald *et al.*, 2001; Missang *et al.*, 2001).

Las pectinas están clasificadas como pectinas de alto y bajo metoxilo en función del DE (Humead y Yousif, 2000).

5.1. Enlaces de calcio

El calcio forma complejos con la pectina a través de los carboxilos libres de las cadenas de pectina. Un incremento en la tendencia a la formación de gel existe mientras el DE decrece. Los enlaces de calcio implican otros grupos funcionales aparte de los grupos carboxilo (Coma, 2010). La fuerte interacción entre el calcio con otros átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo de las pectinas ha sido descrita por Rochas *et al.*

(1990), así como también los complejos de calcio con carbohidratos, tanto neutros como ácidos (Angyal, 1989).

6. Enzimas pectinolíticas

Las actividades enzimáticas que actúan sobre la cadena principal de la pectina son las hidrolasas (poligalacturonasas), que actúan sobre los enlaces α -1,4-glicosídicos, su modo de acción puede ser de tipo “endo”, si actúan de manera aleatoria a lo largo de la cadena principal, o “exo”, si actúan sobre los extremos no reductores de los ácidos oligogalacturónicos (Niture, 2008).

6.1. Función de las enzimas pectinolíticas

Las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas relacionadas que hidrolizan las sustancias pécticas presentes principalmente en las plantas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Sharma *et al.*, 2012). Las pectinasas pueden tener distintas funciones, dependiendo del organismo que las produce. En los hongos saprófitos, estas enzimas son importantes para proveer al microorganismo los nutrientes a partir de los materiales de su medio ambiente. En el caso de los microorganismos fitopatógenos, intervienen en la degradación de la pared celular durante el proceso de invasión microbiana a las células vegetales (Fumani *et al.*, 2011).

En plantas, la actividad de las enzimas pectinasas está implicada en el metabolismo de la pared celular, que involucra el crecimiento celular, la maduración del fruto, la senescencia (proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula) y la abscisión (proceso por el cual una planta pierde una o más partes de su estructura, como puede ser la hoja, un fruto, una flor o una semilla) (Sharma *et al.*, 2012). En general, durante la maduración de los frutos, los tejidos se reblandecen y pierden cohesión, hay un incremento de pectina soluble en agua acompañada de una pérdida de protopectina. Este incremento de pectina soluble en agua se adscribe a la acción de las poligalacturonasas que actúan en conjunto con otras enzimas tales como las pectinmetilesterasas. Simultáneamente, durante el reblandecimiento hay un decrecimiento en el grado de esterificación de la lámina media pectínica debido a la acción de la pectinmetilesterasa (Fumani *et al.*, 2011). Por lo tanto, durante la vida

fisiológica de frutas y vegetales y en los procesos de transformación y almacenamiento de los productos derivados, se producen cambios en el contenido en pectinas y en su estructura que, en gran medida, determinan las modificaciones que se producen en la textura de estos productos. Las poligalacturonasas que se encuentran en la membrana celular de bacterias, levaduras y hongos, fundamentalmente fitopatógenos, son las enzimas responsables de la degradación de la pared celular en los tejidos vegetales y entran en acción de manera natural durante el periodo de maduración, degradan las pectinas de la lámina media y de la pared celular, además son producidas por casi todos los hongos fitopatógenos durante el proceso de infección (Jacob y Prema, 2006).

6.2. Clasificación de las enzimas pectinolíticas

6.2.1. Pectin liasas (PLs): catalizan la ruptura de pectinas desesterificadas a través de un mecanismo de eliminación beta. Las PLs requieren la presencia de Ca^{2+} para ejercer su acción dando lugar a monómeros de ácido galacturónico, ramnosa y dextrina (Fig. 5) (Charnock *et al.*, 2002).

6.2.2. Poligalacturonasas (PGs): catalizan la hidrólisis de las uniones α -(1-4) que mantienen unidos a los residuos de ácido galacturónico (Fig. 5). Existen dos tipos de poligalacturonasas: las exo- PGs que eliminan residuos de ácido galacturónico y las endo-PGs que rompen los enlaces α -1-4 glicosídicos al azar a lo largo de la cadena (Pressey *et al.*, 1971). Los dos tipos de enzimas requieren residuos desesterificados. La acción de las exo-PGs puede estar limitada, ya que termina cuando hay otros residuos en la cadena, como la ramnosa. Ambas enzimas, exo y endo-PGs, se han encontrado en muchos frutos tales como pera, melocotón, pepino y tomate (Dey y Brinson, 1984).

Las PGs están involucradas en el desensamble de las pectinas de la pared celular, esta etapa forma parte de distintos procesos del desarrollo de las plantas (Brummell y Harpster, 2001).

6.2.3. Pectin metil esterases (PME): catalizan la desmetilación del grupo carboxilo en la posición C-6 de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas de peso molecular grande (Fig. 5). La desmetilación cambia el pH y la carga de la pared celular, lo que permite la agregación de los ácidos poliurónicos mediante puentes de Ca^{2+} , esta modificación los hace susceptibles a la degradación por las PGs (Brummell y Harpster, 2001).

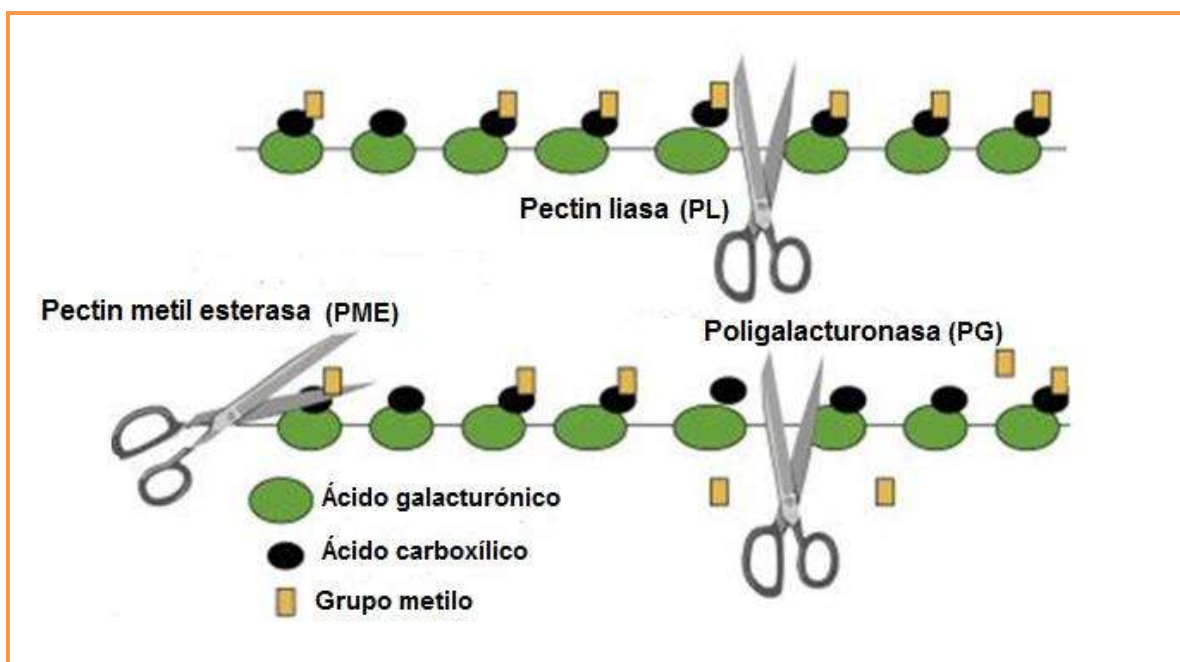


Figura 5. Mecanismos de acción de las enzimas pectinolíticas. (Tomada de Van Rensburg y Pretorius, 2000).

7. Microorganismos productores de pectinasas

Las enzimas pectinolíticas son producidas por una extensa variedad de organismos, tales como las plantas, levaduras, hongos y bacterias. Pero entre ellos destacan los hongos filamentosos debido a su fácil cultivo y su significativa producción de enzimas extracelulares con potencial industrial (Cuadro 1). La diversidad de las enzimas producidas por estos microorganismos proviene de su inherente diversidad metabólica, que se refleja en su habilidad para crecer sobre diferentes sustratos en una gran variedad de condiciones ambientales. Las especies más utilizadas para la producción

de pectinasas de interés industrial pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*, ya que son clasificados como GRAS (Ward *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Diversidad de enzimas pécticas producidas por microorganismos.

Microorganismo	Enzima	pH óptimo	Temperatura óptima °C	Referencia
Bacterias				
<i>Bacillus sp</i> NT-33	Poligalacturonasa	10.5	75	Cao <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus sp</i> DT7	Pectinliasa	8	60	Kashyap <i>et al.</i> , 2000
Hongos				
<i>Aspergillus ficuum</i>	Pectinliasa	5	50	Yadav <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium frequentans</i>	Endo-poligalacturonasa	3.5-5	50	Boirin <i>et al.</i> , 1996
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Endo-poligalacturonasa	3.5	55	Chane y Shewal, 1995
<i>Penicillium paxilli</i>	Pectinliasa	5	35	Szajer y Szajer, 1982
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo-poligalacturonasa	5.5	45	Blanco <i>et al.</i> , 1994
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Endo-poligalacturonasa	4.5	55	Serrat <i>et al.</i> , 2002

8. Aplicaciones industriales de las pectinasas

La primera aplicación comercial de las pectinasas fue en 1930 para la preparación de vinos y jugos de frutas (Kashyap *et al.*, 2001). Décadas más tarde su uso se diversificó (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aplicaciones de las pectinasas.

Industria	Proceso	Referencia
Alimentaria	Clarificación de jugos y vinos	Mollov <i>et al.</i> , 2006
	Función importante en la fermentación de café y té	Fowler <i>et al.</i> , 1997
	Extracción de aceites de cáscaras de vegetales y cítricos	Li <i>et al.</i> , 2012
	Obtención de productos unicelulares	Kashyap <i>et al.</i> , 2001
Textil	Enriado de fibras naturales como lino y cáñamo	Jacob <i>et al.</i> , 2008
Ganadera	Preparación de alimentos concentrados para ovejas, cabras, cerdos y aves	Alkorta <i>et al.</i> , 1998
Investigación	Aislamiento de protoplastos	Chamani <i>et al.</i> , 2012
Aguas residuales	Tratamiento de aguas de industrias que surgen del procesamiento de cítricos	Mehraj Pasha <i>et al.</i> , 2013

Las preparaciones enzimáticas utilizadas en la industria alimentaria son de origen fúngico, su pH óptimo está muy cerca del pH de muchos zumos de fruta (pH 3.0 a 5.5) (Soares *et al.*, 1999).

9. Costo de producción de enzimas

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a catalizadores no biológicos. Aproximadamente el 20% de los 1 mil millones de dólares de la venta mundial de enzimas industriales consiste en celulasas, hemicelulasas y pectinasas; además de que de dos mil enzimas registradas sólo unas 60 son producidas comercialmente y de éstas sólo cinco cubren más del 80 % del mercado (Bhat, 2000).

El costo de producción de las enzimas es considerado un obstáculo importante para la amplia comercialización y aplicación de estos catalizadores en los procesos de hidrólisis enzimática (Walker y Wilson, 1991), ya que representan aproximadamente el 50% del costo total de los procesos de hidrólisis. Las investigaciones se han centrado en reducir el costo de producción de las enzimas, al considerar tres enfoques principales que son: la detección de nuevos microorganismos con capacidad para producir enzimas; la mejora de cepas industriales ya existentes y la mejora de factores relacionados a la producción de estas enzimas, tales como la elección de sustrato (Szakács y Tengerdy, 1997), condiciones de cultivo, el reciclaje de las enzimas y el rediseño de procesos (Rivela *et al.*, 2000). Estos enfoques representan una oportunidad para reducir el costo de las enzimas, en particular la detección de microorganismos con nuevas enzimas.

10. Justificación

Las pectinasas tienen diversas aplicaciones industriales, pero su costo de producción es una de las principales limitaciones para su uso, por lo que se ha intensificado la búsqueda de organismos con notable actividad pectinolítica. En particular, los hongos filamentosos destacan por su capacidad para producir estas enzimas, solo un pequeño porcentaje de este grupo de microorganismos se ha estudiado. La posibilidad de encontrar nuevas fuentes microbianas con actividad pectinolítica interesante a partir de diferentes ecosistemas, ofrecerá alternativas para mejorar la eficiencia de los procesos de fermentación en la obtención de estas enzimas.

11. Preguntas de investigación

¿Los aislados fúngicos obtenidos de diferentes ecosistemas presentan actividad pectinolítica?

¿Cuál aislado fúngico es el mejor productor de enzimas pectinolíticas?

12. Objetivos

12.1. General

Seleccionar y estudiar un aislado fúngico con notable actividad pectinolítica.

12.2. Específicos

1. Determinar el índice pectinolítico de aislados fúngicos de diferentes ecosistemas.
2. Seleccionar un aislado fúngico productor de enzimas pectinolíticas.
3. Identificar molecularmente al aislado fúngico seleccionado.
4. Evaluar la producción de pectinasas en fermentación líquida por el aislado fúngico seleccionado.
5. Determinar la actividad pectinolítica de los extractos enzimáticos del aislado fúngico seleccionado en gel de poliacrilamida.

13. Materiales y métodos

13.1. Material biológico

Una colección de ciento tres hongos fitopatógenos aislados de tres ecosistemas diferentes: frutícola, hortícola y boscoso, de diferentes regiones de Zacatecas, Guanajuato y Michoacán.

13.2. Medio de mantenimiento y propagación

Medio basal (BM) se utilizó, cuya composición fue (g/L): NH_4NO_3 , 5; KH_2PO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001; extracto de levadura, 0.1; glucosa al 4 % (w/v), y agar bacteriológico al 1.6 % (w/v). Los aislados fúngicos se sembraron en BM con un propágulo de 5 x 5 mm en la superficie del medio, las placas se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente para su uso posterior.

13.3. Determinación de índice pectinolítico (IP)

Los aislados fúngicos se sembraron en BM enriquecido con pectina al 1% (w/v), con tres propágulos de 5 mm x 5 mm separados a la misma distancia. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que las colonias alcanzaron un crecimiento de 2 cm de diámetro. Las placas se tiñeron con una solución de Bromuro de hexadecil trimetil amonio (cetrimida, marca Sigma) al 1 % (w/v), se incubaron en agitación rotatoria durante 30 min., después de este periodo, la superficie de las placas se lavó tres veces con agua tridestilada. El área de degradación de la pectina se observó como una zona transparente, mientras que las zonas no degradadas presentaron un color blanco opaco debido a la precipitación de la pectina no degradada.

Se obtuvieron imágenes digitalizadas de las placas antes y después de la tinción, para medir los diámetros de crecimiento fúngico y degradación de la pectina por medio de un procesador de imágenes digitales (ImageJ®). Para la determinación del IP, el cociente del diámetro del halo de degradación de la pectina y el diámetro de crecimiento de las colonias se calculó. Los datos se analizaron estadísticamente después de calcular el intervalo de confianza del IP y se compararon los valores de IP de los aislados fúngicos ($\alpha = 0.05$).

13.4. Análisis de correspondencia

La selección del mejor aislado fúngico con la mayor actividad pectinolítica se realizó mediante un análisis de correspondencia. Es una técnica estadística multivariada que permite procesar gran cantidad de datos ordenados como variables categóricas en una matriz de dos vías. En el análisis de correspondencia se distribuyen las variables categóricas en un espacio multidimensional para conocer patrones de comportamiento de las variables y su dependencia o asociación. Las variables categóricas fueron los aislados fúngicos, el crecimiento en estado sólido, el ecosistema del cual fueron obtenidos y el IP. Los datos se procesaron en el Software Statistica versión 8.

13.5. Identificación molecular del aislado fúngico

13.5.1. Extracción del DNA genómico

El micelio del aislado fúngico, previamente sembrado y crecido sobre papel celofán en medio PDA, se colocó en un mortero con nitrógeno líquido, se trituró y un polvo fino se obtuvo, que se transfirió a un tubo eppendorf y 600 µL de tampón de extracción de ADN se añadieron más 5 µL de RNasa, la muestra se mezcló y se incubó a 65 °C en baño de agua durante 15 minutos para después centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) se añadió, el líquido se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min para posteriormente extraer la fase superior, que se transfirió a un nuevo tubo. El paso anterior se repitió una vez más. Posteriormente, el ADN aislado se precipitó con adición de 600 µL de isopropanol a 4 °C y se colocó en tubos a -20 °C por 10 min. El precipitado se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se descartó. El sedimento se lavó dos veces con 1 mL etanol al 70 % (v/v) a 4 °C y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. El sedimento se resuspendió en 50 µL de buffer TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

13.5.2. Amplificación de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS)

La región de los espaciadores transcritos internos (ITS) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia del producto amplificado se obtuvo y se alineó con secuencias reportadas en la base de datos del National Center

for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa BLAST. El procedimiento de amplificación para estos genes fue el que se muestra en el cuadro 3 de acuerdo con Carbone y Kohn (1999).

Cuadro 3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	480	1
Desnaturalización	95	15	35
Alineamiento	----	1200	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	30	1

13.6 Curso temporal de la actividad pectinolítica en fermentación en cultivo líquido

El medio basal líquido utilizado para las fermentaciones contenía una solución de microelementos (KH_2PO_4 , 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; CaCl_2 , 0.3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.56 g; CoCl_2 , 2 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg; Urea, 0.1 g), solución de vitaminas (Sigma), pectina al 1% (w/v) (Sigma), y dextrosa al 0.1 % (w/v) (Sigma). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min y se inoculó con micelio del hongo crecido previamente sobre papel celofán en placas de PDA. Para el monitoreo de la actividad pectinolítica extracelular se tomaron muestras cada 24 h durante 14 d de fermentación. Los datos se analizaron estadísticamente con el software Statistica versión 8.

13.7 Cuantificación de proteína

La proteína extracelular se cuantificó por el método de Lowry *et al.* (1951) y se utilizó BSA como estándar. La absorbencia de las muestras se midió a 640 nm en un espectrofotómetro marca Cary50 Bio.

13.8 Determinación de la actividad pectinolítica

La mezcla de reacción contenía 0.8 mL de pectina al 1% (w/v) y 0.2 mL de enzima, y se incubó a 40 °C durante 30 min. La reacción se detuvo al agregar 1 mL de DNS y la mezcla de reacción se hirvió en baño de agua durante 15 mins. Los tubos se colocaron en baño de agua fría por 10 min, y se midió la absorbencia a 540 nm. Ácido D-glucorónico-lactona se utilizó como estándar.

13.9 Concentración de la proteína extracelular de las fermentaciones líquidas

El sobrenadante de la fermentación se separó del micelio, al filtrar a través de papel filtro y luego con una membrana de 0.45 μm , el líquido clarificado se centrifugó a 3600 rpm por 15 min y se congeló a -20 °C por 24 h y se liofilizó en un equipo marca Labconco (Freeze Dry System/LYPH LOCK® 4.5) a -40 °C y 50×10^{-3} MBAR de presión de vacío. El polvo seco de la proteína se utilizó para ensayos electroforéticos.

13.10 Electroforesis en gel SDS-PAGE

Un gel discontinuo de poliacrilamida se preparó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). El gel concentrador al 4 % se preparó con las siguientes cantidades: 6.1 mL de agua desionizada, 1.3 mL de acrilamida al 30 %, 2.5 mL de buffer del gel Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y 0.1 mL de SDS al 10% (w/v). El gel de resolución al 12 % contenía 3.4 mL de agua desionizada, 4 mL de acrilamida al 30 %, 2.5 mL de buffer del gel Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y 0.1 mL de SDS al 10 % (w/v). Las muestras se aplicaron al gel de la siguiente manera: carril 1, 45 μL de muestra + 90 μL de buffer de muestra Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 sin SDS; carril 2, 45 μL de muestra + 90 μL de buffer de muestra Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 con SDS; carril 3, 45 μL de muestra + 90 μL de buffer de muestra Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 con SDS, hervidas por 4 min a 95 °C; carril 4, 90 μL de buffer de muestra Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 con SDS y 4.75 μL de β -mercaptoetanol, hervida por 4 min a 95 °C; carril 5, 45 μL de muestra + 90 μL de buffer de muestra Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 con SDS, 4.75 μL de β -mercaptoetanol, hervidas por 4 min a 95 °C. La electroforesis se realizó a 111 V durante 60 min, en baño de hielo.

13.10.1 Zimograma

Después de la electroforesis, el gel se lavó tres veces con buffer de citrato de sodio 50 mM pH 5.0 a 4 °C y se incubó en agitación suave. La actividad de pectinasas se detectó

colocando el gel sobre una placa de agarosa al 1 % (w/v) que contenía ácido poligalacturónico al 0.1 % (w/v) y se incubó durante 48 h a 45 °C. La placa con agarosa se tiñó con una solución de bromuro de hexadecil trimetil amonio (cetrimida) al 1 % (w/v).

13.10.2 Tinción con nitrato de plata

El gel de poliacrilamida se incubó en una solución de metanol:agua desionizada:ácido acético (40:50:10, v/v) durante 1 h. Posteriormente, el gel se lavó en agua desionizada durante 12 h para retirar todo el ácido acético. El gel se sumergió en una solución de tiosulfato de sodio al 0.02 % (0.04 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en 200 mL de agua desionizada) por un 1 min, y se lavó con agua desionizada tres veces durante 1 min. El gel se incubó durante 20 min en una solución de nitrato de plata al 0.1 % (0.2 g de AgNO_3 en 200 mL de agua desionizada y formaldehído al 0.02 %, v/v) a 4 °C. El gel se lavó en agua desionizada tres veces durante 1 min, y se incubó con una nueva disolución de nitrato de plata. El gel se lavó con agua desionizada durante 1 min. Para la tinción del gel se añadió carbonato de sodio al 3 % (7,5 g de Na_2CO_3 en 250 ml de agua desionizada), formaldehído al 0.05 % (125 μL de formaldehído). La solución reveladora se reemplazó inmediatamente después de observar la generación de un color amarillo. El gel se incubó en esta solución hasta observar las bandas de proteínas. El gel se lavó con agua desionizada durante 1 min. La tinción se detuvo con ácido acético al 5 % (v/v).

14. Conclusión

El aislado 47, un hongo filamentoso de ecosistemas hortícolas, se seleccionó ya que presentó el mayor IP respecto al resto de los aislados fúngicos estudiados, se identificó molecularmente como *Fusarium solani*.

15. Referencias bibliográficas

- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claise, A. y Duchiron, F. 2011. Yeasts: An attractive source of pectinases-From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*. 46: 8: 1525-1537.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. y Serra, J. L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 33: 1: 21-28.
- Almeida, C., Brányik, T., Moradas-Ferreira, P. y Teixeira, J. 2003. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96: 6: 513-518.
- Angyal, S. J. 1989. Complexes of metal cations with carbohydrates in solution. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 47: 1-43.
- Annis, S. L. y Goodwin, P. H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 1: 1-14.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 5: 355-383.
- Blanco, P., Sieiro, C. y Villa, T. G. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 175: 1: 1-9.
- Borin, M. F., Said, S. y Fonseca, M. J. V. 1996. Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 6: 1616-1620.
- Brett, C. T. y Waldron, K. W. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Editorial Chapman and Hall. 2da edición. London. 313-337.
- Brumano, M. H. N., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. y Silva, D. O. 1993. Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. *Rev. Microbiology*. 24: 3: 175-178.
- Brummell, D. A. y Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Cell Walls*. 47: 311-340.
- Caffall, K. H. y Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344: 14: 1879-1900.
- Carbone, I. y Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91: 3: 553-556.

- Cao, J., Zheng, L. y Chen, S. 1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme and Microbial Technology*. 14: 12: 1013-1016.
- Chamani, E., Tahami, S. K., Zare, N., Zakaria, R. A., Mohebodini, M. y Joyce, D. 2012. Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in *Lilium ledebeourii* Bioss. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40: 2: 123-128.
- Chane, P. S. y Shewal, J. G. 1995. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*. Effects of culture conditions. *Folia Microbiologica*. 40: 1: 111-117.
- Charnock, S. J., Brown, I. E., Turkenburg, J. P., Black, G. W. y Davies, G. J. 2002. Convergent evolution sheds light on the anti- β -elimination mechanism common to family 1 and 10 polysaccharide lyases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 99: 19: 12067-12072.
- Coma, Véronique. 2010. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant Properties. *Polímeros* 20: 2: 1-12.
- Cutillas-Iturralde, A., Zarra, I. y Lorences, E. P. 1993. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization during fruit ripening occurs in apparent absence of polygalacturonase activity. *Physiologia Plantarum*. 89: 2: 369-375.
- Dey, P. M. y Brinson, K. 1984. Cell wall and fruit ripening. *Advance Carbohydrate Chemical Biochemistry*. 42: 339-382.
- Doco, T., O'Neill, M. A. y Pellerin, P. 2001. Determination of the neutral and acidic glycosyl residue compositions of plant cell polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glucoside derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 46: 3: 249-259.
- Donald, J., Yasar, K. y Jiwon, J. 2001. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. *Horticultural Sciences*. 13: 2: 224-241.
- Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T. y Viniegra-González, G. 2006. Production of hydrolytic depolymerizing pectinases. *Food Technology and Biotechnology*. 44: 221-227.
- Fischer, R. L. y Bennett, A. B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 1: 675-703.
- Fowler, M. S., Leheup, P. y Cordier, J. L. 1997. Cocoa, coffee and tea. *Microbiology of Fermented Foods*. 2: 128-147.

Friedrich, J., Cimerman, A. y Steiner, W. 1989. Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of different aeration/agitation regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 5: 490-494.

Fredes Monsalves, C., Loyola López, N. y Muñoz Cruz, J. C. 2009. Extracción de pectinas de *Vitis labrusca* cv. concord para producir jaleas. *IDESIA*. 27: 3: 9-14.

Fumani, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R., Inoue, T. y Phillips, G. O. 2011. Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids*. 25: 221-229.

García, A. y Ramírez, Y. 2008. Evaluación de la producción de pectinasas a partir de *A. niger*. Tesis de pregrado. Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT Medellín, Colombia.

Gummadi, S. N. y Panda, T. 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Process Biochemistry*. 38: 7: 987-996.

Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi of México. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95: 6: 641-655.

Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N. y Beg, Q. K. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 4-5: 409.

Hosmer Caffall, K. y Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344: 1879-1900.

Humead, M. y Yousif, A. 2000. Preparation and evaluation of grapes' jam and jelly. *Agricultural Sciences*. 27: 241-252.

Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A. y Albersheim, P. 1999. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 13098-13104.

Ishii, T. y Matsunaga, T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*. 57: 969-974.

Jacob, N. y Prema, P. 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology Biotechnology*. 44: 2: 263-267.

- Jacob, N., Niladevi, K. N., Anisha, G. S. y Prema, P. 2008. Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research* 163: 538-544.
- Jayani, R. S., Saxena, S. y Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 40: 9: 2931-2944.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the comercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77: 215-227.
- Kertesz, Z. I. 1952. The pectic substances. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 41: 1: 54.
- Knogge, W. 1998. Fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 324-328.
- Kobayashi, M., Match, T. y Azuma, J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology*. 110: 3: 1017-1020.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. y Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2: 3: 1-10.
- Lowry, D. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 268-275.
- Mehraj Pasha, K., Anuradha, P. y Subbarao, D. 2013. Applications of pectinases in industrial sector. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. 16: 1: 89-95.
- Missang, C., Renard, C., Baron, A. y Drilleau, J. 2001. Cell wall polysaccharides of bush butter (*Dacryodes edulis* (G Don) HJ Lam) fruit pulp and their evolution during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 773-780.
- Mollov, P., Mihalev, K., Buleva, M. y Petkanchin, I. 2006. Cloud stability of apple juices in relation to their particle charge properties studied by electro-optics. *Food Research International*. 39: 519-524.

- Nair, S. R. y Panda, T. 1997. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*. 16: 3: 169-173.
- Niture, Suryakant K. 2008. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*. 63: 1: 1-19.
- Okafor, U. A., Okochi, V. I., Chinedu, S. N., Ebuehi, O. A. T. y Onyeme Okerenta, B. M. 2010. Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-wastes. *African Journal of Microbiology Research*. 4: 24: 2729-2734.
- Páez, G., Marín, M., Mármol, Z., Ferrer, J. y D'Addosio, R. 2005. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*. 22: 3: 240-249.
- Palin, R. y Geitmann, A. 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *BioSystems*. 109: 397-402.
- Pariza, M. W. y Johnson, E. A. 2001. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 33: 2: 173-186.
- Patil, S. R. y Dayanand, A. 2006. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*. 97: 16: 2054-2058.
- Rivela, I., Couto, R. y Sanromán, A. 2000. Extracellular lignolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor. *Biotechnology Letters*. 22: 18: 1443-1447.
- Rochas, C., Rinaudo, M. y Landry, S. 1990. Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan. *Carbohydrate Polymers*. 12: 255-266.
- Sarkar, P., Bosneaga, E. y Auer, M. 2009. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany*. 60: 13: 3615-3635.
- Sathyanarayana, N. G. y Panda, T. 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Process Biochemistry*. 38: 7: 987-996.
- Schols, H. A. y Voragen, A. G. 1996. Complex pectins: structure elucidation using enzymes. *Progress in Biotechnology*. 14: 3-19.

Serguschenko, I., Kolenchenko, E. y Khotimchenko, M. 2007. Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. *Nutrition Research*. 27: 633-639.

Serrat, M., Bermúdez, R. C. y Villa, T. G. 2002. Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 97: 3: 193-208.

Sharma, N., Rathore, M. y Sharma, M. 2012. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 12: 45-60.

Soares, M., Da Silva, R. y Gomes, E. 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiología*. 30: 299-303.

Szajer, I. y Szajer, C. 1982. Pectin lyase of *Penicillium paxilli*. *Biotechnology Letters*. 4: 9: 549- 552.

Szakacs, G. y Tengerdy, R. P. 1997. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 5: 487-490.

Teixeira, M. F. S., Lima Filho, J. L. y Durán, N. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 4: 286-290.

Van Rensburg, P. y Pretorius, I. S. 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient bio-transformations. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21: Special: 52-70.

Vicens, A., Fournand, D., Williams, P., Sidhoum, L., Moutounet, M. y Doco, T. 2009. Changes in polysaccharide and protein composition of cell walls in grape berry skin during ripening and over-ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 2955-2960.

Wakabayashi, Kazuyuki. 2000. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *Journal of Plant Research*. 113: 3: 231-237.

Walker, L. P. y Wilson, D. B. 1991. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An Overview. *Bioresource Technology*. 36: 1: 3-14.

Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J. y Singh, A. 2005. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.

Whitehead, M. P., Shieh, M. T., Cleveland, T. E., Cary, J. W. y Dean, R. A. 1995. Isolation and characterization of polygalacturonase genes (pecA and pecB) from *Aspergillus flavus*. Applied Environmental and Microbiology. 61: 9: 3316-3322.

Yadav, S., Yadav, P., Yadav, D. y Yadav, K. 2008. Purification and characterization of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices. Annals of Microbiology. 58: 1: 61-65.